

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 60—64, Januar 1970

Untersuchung der Bindung von Schilddrüsenhormonen an Humanserum-Lipoproteine

Von G. KOSTNER und I. ABOU EL EISCH

Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. A. Holasek)

(Eingegangen am 25. September 1969)

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Humanserumlipoproteine für Schilddrüsenhormone wurden very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) und high density lipoproteins (HDL) mit Hilfe spezifischer Antikörper bzw. einer polymeren Kieselsäure (Aerosil) aus dem Serum entfernt und die Verteilung der Hormone bestimmt. Dies erfolgte einerseits durch Bestimmung des eiweißgebundenen Jods, andererseits durch Messung der Radioaktivität von in vivo und in vitro markierten Seren. Dabei wurde gefunden, daß keines der erwähnten Lipoproteine im Gemisch mit den übrigen Serumproteinen nennenswerte Mengen an Schilddrüsenhormonen bindet. Versuche mit isolierten Lipoproteinen zeigten, daß diese bis zu 80% des zugefügten T_4 - ^{131}J aufzunehmen imstande sind.

Studies on the binding of thyroid hormones to human serum lipoproteins

In order to determine the binding between human serum lipoproteins and thyroid hormones, very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins (HDL) were separated from the serum with the aid of specific antibodies or a polymeric silicic acid (Aerosil). The distribution of the hormones was then determined by measurement of the protein-bound iodine and measurement of the radioactivity of in vivo and in vitro labelled sera. Negligible amounts of thyroid hormones were bound by the above lipoproteins in the presence of the other serum proteins. Experiments with isolated lipoproteins showed that these are able to bind up to 80% of the added T_4 - ^{131}J .

Die exogenen Schilddrüsenhormone werden zum größten Teil von 3 Serumproteinen, nämlich Präalbumin (TBPA), Albumin (TBA) und dem thyroxinbindenden Globulin (TBG) transportiert (1, 2, 3, 4, 5).

Da mit Hilfe der Immunoelktrophorese und anschließender Autoradiographie von Humansen, die radioaktives Thyroxin (T_4) enthielten, Aktivität in den Lipoproteinbanden gefunden wurde, gelten auch diese als spezifische Thyroxinträger. So konnte K. MRYAI (6) neben TBPA, TBA und TBG eine Bindung von T_4 an α_1 - und prae- β -Lipoproteine feststellen. Auch von anderen Arbeitsgruppen wird den Lipoproteinen eine Trägerfunktion für Schilddrüsenhormone zugeschrieben (7, 8, 9, 10, 11). Gelegentlich sind noch andere, zum Teil unbekannte thyroxinbindende Proteine beschrieben worden (5, 12, 13).

Die Bindung und quantitative Verteilung der Schilddrüsenhormone zwischen den einzelnen thyroxinbindenden Proteinen ist stark vom pH-Wert (14) sowie der Art und Konzentration von Fremdstoffen abhängig (3, 5, 15, 16, 17). Aus diesem Grunde konnte die Rolle des TBPA als T_4 -bindendes Protein erst relativ spät entdeckt werden (18).

Da reine Lipoproteine aus dem Serum nach den herkömmlichen Methoden nur unter beträchtlicher Veränderung des Milieus (Erhöhung der Salzkonzentration und anschließendes Ultrazentrifugieren bzw. Zusatz von Salzen und selektiven Fällungsmitteln) gewonnen werden können, erschien es nicht sinnvoll, eine Isolierung nach diesen Methoden durchzuführen und anschließend die darin befindliche Menge T_4 zu bestimmen. Hingegen

erlaubt die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion in kürzester Zeit und ohne Veränderung des pH-Wertes und der Salzkonzentration, alle Proteine aus einem Gemisch zu entfernen und anschließend zu isolieren. Mit dieser Methode gelang es zu beweisen, daß nicht 30% des Serum- T_4 , sondern nur etwa 15% an TBPA gebunden sind (3). Nach der gleichen Methode, jedoch ohne Zusatz von radioaktivem T_4 zum Serum, fanden wir bei gesunden Personen zwischen 19 und 21% Bindung des Gesamt- T_4 an TBPA (unveröffentlichte Ergebnisse).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsvermögen von Schilddrüsenhormonen an Lipoproteine unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe immunochemischer Methoden untersucht. Der von Lipoproteinen gebundene Hormonanteil betrug unter den gewählten Bedingungen weniger als 0,4%.

Material und Methoden

Die Analyse der Blutproben, die 12 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme abgenommen wurden, erfolgte innerhalb von 24 Std. Es wurden Seren von Euthyreoten, Hyperthyreoten und Hypothyreoten eingesetzt. In vivo radioaktiv markierte Seren wurden 48 Std. nach Gabe von 3—100 mC ^{131}J (Radio-Jodtherapie) abgenommen.

Reine Antikörper gegen β -Lipoproteine wurden nach G. KOSTNER und A. HOLASEK (19) gewonnen. Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten reinen Antikörper stammten vom Pferd und wurden durch Druckdialyse gegen isotone NaCl-Lösung auf eine Konzentration von etwa 8% gebracht. Mit diesem Antikörper wurde auch ein Immunoabsorber hergestellt (20). Nach einem etwas modifizierten Verfahren wurde reiner Antikörper gegen Human- α -Lipoproteine vom Kaninchen präpariert (in Vorbereitung).

Die Isolierung reiner Lipoproteine erfolgte nach Einstellen der Dichte des Serums mit festem KBr auf die Werte 1,063 und 1,21 in einer präparativen Ultrazentrifuge (Beckman L 4). Very low density lipoproteins (VLDL) wurden bei der Eigendichte des Serums durch Flotation gewonnen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Lipoproteinlösungen gegen isotone NaCl-Lösung vom pH 7,4 dialysiert und gleich für die Untersuchung eingesetzt.

Nach der Gewinnung von Serumlipiden durch Extraktion von 20 ml gepooltem Humanserum nach FOLCH (21) wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft und die Lipide in Krebs-Ringerlösung mit einem Ultraschallgerät emulgiert. Dieses Gemisch wurde mit $L-T_4$ - ^{131}J inkubiert. Anschließend wurden die Lipide von der Krebs-Ringerlösung in der Ultrazentrifuge mit einem SW-Rotor bei $2 \cdot 10^6$ g/Min. abgetrennt.

Radioaktives $L-T_4$ - ^{131}J mit einer spezifischen Aktivität von 20–50 mC/mg, das vor dem Einsatz papierchromatographisch gereinigt wurde, stammte vom Radiochemical Centre Amersham.

Um die Seren und Lipoproteinlösungen in vitro radioaktiv zu markieren, wurden zu je 20 ml Lösung $4 \mu C$ $L-T_4$ - ^{131}J zugesetzt. Diese Mischung blieb vor der Analyse 3 Stdn. bei Raumtemperatur und 12 Stdn. bei 4° stehen.

Die Aktivitäten wurden mit dem Zählgerät Frieske und Hoepfner 49 A Grundsonde FH 421AS, Bohrlochscintillationskristall Z 11 in Verbindung mit einem 100 Kanal-Gamma-Spektrometer, TMC Gammascopie II in Einkanalschaltung (0,36 MeV) gemessen. Zur Wahrung der Geometrie wurden alle Proben in identischen Küvetten mit gleichem Volumen (4 ml) vermessen.

Die Werte des eiweißgebundenen Jods (PBI-Werte) wurden in einer Apparatur zur automatischen Jodbestimmung (22) ermittelt.

Alle zur Analyse verwendeten Chemikalien waren p. A. Reagenzien der Firma E. Merck.

Arbeitstechnik

Die Lipoproteine wurden im Äquivalenzpunkt, der von jedem Serum und von jeder Lipoproteinlösung nach HEIDELBERGER (23) bestimmt wurde, präzipitiert. Zu je 1 ml Probe wurde reine Antikörperlösung (etwa $15 \mu l$) zugesetzt und die Mischung 2 Stdn. bei Raumtemperatur und 14 Stdn. bei 4° stehen gelassen. Anschließend wurde zentrifugiert und das Präzipitat 2- bzw. 4mal mit je 3 ml isotoner Natriumchloridlösung, deren pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt wurde, gewaschen und in 0,1N NaOH (auf 1 ml) gelöst. Von der ursprünglichen Probe, dem Überstand nach dem Zentrifugieren und dem gelösten Immunpräzipitat wurden Aktivitätsmessungen von je 4 ml Probe und PBI-Bestimmungen von je 0,2 ml Probe durchgeführt.

Die Immunoabsorption der low density lipoproteins (LDL) + VLDL an mit Antikörper beladene Bromacetylcellulose (20) erfolgte, indem zu jeder Probe soviel Immunoabsorber zugesetzt wurde, daß bei anschließender Ringprobe keine positive Reaktion erhalten wurde.

Zur Adsorption der Gesamt-Lipoproteine an Aerosil (24) wurde je 1 ml Serum bzw. Lipoproteinlösung mit 20 mg Aerosil versetzt

und 6 Stdn. bei 45° gerührt. Anschließend wurde zentrifugiert, der Niederschlag mit isotoner NaCl-Lösung vom pH 7,4 (4mal je 3 ml) gewaschen und die Lipoproteine mit 40proz. NaCl-Lösung in 0,1N NaOH desorbiert.

Zu 1 ml reiner Lipoproteinlösung wurden 0,5 ml bzw. 0,25 ml/60proz. Trichloressigsäure zugesetzt. Nach dem Zentrifugieren wurde die Aktivität der überstehenden Lösung bestimmt.

Ergebnisse

Ermittlung der Bindung von Schilddrüsenhormonen an Lipoproteine durch PBI-Bestimmungen

Tabelle 1 zeigt die PBI-Werte von 10 verschiedenen Seren vor und nach der Fällung der Lipoproteine mit spezifischen Antikörpern bzw. Adsorption mit Aerosil.

Tab. 1

PBI-Werte in $\mu g/100$ ml von Humansen vor und nach der Fällung der VLDL, LDL und HDL mit spezifischen Antikörpern und Adsorption der Gesamtlipoproteine an Aerosil

Serum Nr.	Ausgangsserum	PBI in $\mu g/100$ ml		
		Serum ohne VLDL und LDL (Fällung mit AK)	Serum ohne HDL (Fällung mit AK)	Serum ohne Lipoproteine (Adsorption an Aerosil)
1 St. L.	2,1	2,1	2,2	2,1
2 K. G.	2,8	2,8	2,8	2,7
3 N. A.	4,6	4,5	4,6	4,7
4 W. A.	5,6	5,6	5,6	5,6
5 P. L.	6,5	6,4	6,5	6,4
6 H. B.	6,8	6,9	6,8	6,9
7 A. H.	7,2	7,3	7,2	7,3
8 K. K.	10,5	10,4	10,4	10,6
9 M. S.	16,7	16,7	16,7	16,7
10 I. Sch.	18,0	18,0	18,1	18,0

Die Verdünnung der Seren mit Antikörperlösung ist in den Werten der Tabelle berücksichtigt. Alle Zahlen stellen Mittelwerte aus 3 Bestimmungen dar. Die Abweichung der Serum-PBI-Werte vor und nach der Fällung der Lipoproteine liegt innerhalb der Fehlergrenze der Methode. Vom gefällten Präzipitat wurde keine PBI-Bestimmung durchgeführt, da PBI-Werte unter $0,5 \mu g/100$ ml mit dieser Methode nur ungenau bestimmt werden können.

Radioaktivitätsmessungen an in vivo markierten Seren

Die Analysenergebnisse der radioaktiven in vivo markierten Seren sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefaßt. Im Immunpräzipitat der Lipoproteine sind nach 2mal-

Tab. 2

Aktivität von in vivo radioaktiv markierten Humansen vor und nach der Fällung der Lipoproteine mit spezifischen Antikörpern bzw. Adsorption der Gesamtlipoproteine an Aerosil

Serum Nr.	Verabreichte Menge ^{131}J in mC	PBI in $\mu g/100$ ml	Ausgangsserum	Aktivität von 1 ml Serum in Imp./Min.			Überstand nach Adsorption d. Lipoproteine mit Aerosil
				Serum nach Fällung d. LDL u. VLDL mit Antikörpern	Serum nach Adsorption d. LDL u. VLDL mit Immunoabsorber	Serum nach Fällung d. HDL mit Antikörpern	
11 H.H.	3,2	16,1	28240	28420	28100	28310	28120
12 B. Sch.	4,4	12,4	31780	31490	31610	31980	31810
13 L. M.	5,0	14,1	35200	35120	35280	35470	35370
14 J. G.	100,0	1,2	40030	40370	40120	39690	40130
15 H. F.	100,0	3,2	112120	112490	111970	112360	112300

Tab. 3

Radioaktivität der VLDL, LDL und HDL nach der Fällung mit spezifischen Antikörpern bzw. Adsorption mit Aerosil aus in vivo radioaktiv markierten Seren

Serum Nr.	Aktivität der Lipoproteine von 1 ml Serum in Imp./Min.					Normalzerstreuung
	LDL + VLDL mit Antikörpern gefällt		HDL mit Antikörpern gefällt		VLDL + LDL + HDL von Aerosil desorbiert	
	2mal gewaschen	4mal gewaschen	2mal gewaschen	4mal gewaschen		
11 H. H.	112	51	120	47	34	24
12 B. Sch.	121	44	114	51	41	19
13 L. M.	138	52	131	56	48	18
14 J. G.	128	60	134	54	51	19
15 H. F.	412	98	420	114	80	17

Tab. 4

Lösung von T_4 - ^{131}J in VLDL, LDL und HDL: Nach der Inkubation der reinen Lipoproteine mit T_4 - ^{131}J wurde eine Fällung mit Antikörpern, eine Adsorption an Aerosil und eine Fällung mit Trichloressigsäure durchgeführt und die Aktivität bestimmt

Lipoprotein 0,3proz.	Ausgangslösung: Imp./Min.	Aktivität von 1 ml Lösung							
		Überstand nach Fällung mit Antikörpern		Überstand nach Fällung mit Trichloressigsäure 2:1		Überstand nach Fällung mit Trichloressigsäure 4:1		Überstand nach Adsorption mit Aerosil	
		Imp./Min.	%	Imp./Min.	%	Imp./Min.	%	Imp./Min.	%
VLDL	81750	20420	25	47230	58	25780	31	18290	23
LDL	85240	16710	18	50310	59	28110	33	17970	21
HDL	94320	21420	23	55120	59	27940	30	20990	22

gem Waschen etwa 0,3% und nach 4maligem Waschen nur mehr > 0,1% der Gesamtaktivität vorhanden. Die Variation der Zählraten der Seren vor und nach der Entfernung der Lipoproteine liegt innerhalb der Fehlergrenze der Aktivitätsmessung.

Ergebnisse der in vitro mit T_4 - ^{131}J markierten Seren

Um den Unterschied zwischen in vivo und in vitro Versuchen festzustellen, wurden Humanserum mit T_4 - ^{131}J versetzt und nach Inkubation die gleichen Versuche wie oben durchgeführt. Die Werte zeigten praktisch keine Unterschiede. Nach 4maligem Waschen des Immunpräzipitates war weniger als 0,1% der Aktivität in den Lipoproteinen zu finden. Selbst nach Absättigung des TBG und TBPA durch Zusatz von inaktivem T_4 (0,05 mg/ml) und anschließender Inkubation mit T_4 - ^{131}J konnte keine höhere Aktivität in den Lipoproteinen gemessen werden.

In vitro Versuche mit reinen Lipoproteinen

Nach der Inkubation reiner VLDL, LDL und high density lipoproteins (HDL) einer Konzentration von etwa 0,3% mit T_4 - ^{131}J wurden die Lipoproteine mit reinem Antikörper bzw. 60proz. Trichloressigsäure gefällt. Tabelle 4 enthält die auf diese Weise gewonnenen Ergebnisse. Die Aktivitätsverteilung zwischen Lipoproteinpräzipitat und Überstand hängt offenbar von der Art der Fällung bzw. Adsorption ab und bewegt sich zwischen 20 und 80% Bindung des Gesamt- T_4 an Lipoproteine.

Aktivitätsverteilung von T_4 - ^{131}J zwischen wässriger und Lipidphase einer Emulsion von Serumlipiden in Krebs-Ringerlösung

Um zu untersuchen, ob der Proteinanteil der Lipoproteine eine Rolle bei der Bindung von T_4 spielt oder ob

die Aktivität der Lipoproteine nur durch Gleichgewichtseinstellung auf Grund der Nernst'schen Verteilung hervorgerufen wird, wurde die Verteilung von T_4 - ^{131}J zwischen Wasser- und Lipidphase untersucht. Aus Tabelle 5 kann entnommen werden, daß etwa 65% der Radioaktivität in der Lipidphase vorhanden war.

Tab. 5

Verteilung von T_4 - ^{131}J zwischen wärr. und Lipidphase nach Inkubation einer Lipidemulsion in Krebs-Ringerlösung

Lösung	Lipide mg/100 ml	Aktivität von 1 ml in Imp./Min.	Aktivität der wärr. Phase nach Zentrifugieren Imp./Min.	%
A	200	91280	31240	34
B	200	78450	27400	35
C	200	74230	27580	37

Diskussion

Die Untersuchung der Bindung von Thyroxin an Serumproteine mit Hilfe der Papier-(16), Acetatfolien-(25), Stärkekegel- und Agargelelektrophorese (16) sowie Polyacrylamidgelelektrophorese (26) ergab, daß neben einigen unbekannten Proteinen TBG, TBPA und TBA die Hauptmenge der jodhaltigen Schilddrüsenhormone im Serum transportieren. Neben den individuellen Schwankungen, hervorgerufen durch Alter und Geschlecht (27), Schwangerschaft (28) und verschiedene Krankheiten (29) ist, wie erwähnt, die qualitative und quantitative Verteilung der Schilddrüsenhormone unter den Serumproteinen stark von den Versuchsbedingungen abhängig. Daher ist es notwendig, die zu untersuchenden Proteine möglichst rasch und schonend zu isolieren. Diese Bedingungen werden praktisch nur von immunochemischen Methoden erfüllt. Bei Zusatz von radioaktivem T_4 und anschließender Elektrophorese (16) können schon deshalb keine genauen

Ergebnisse der quantitativen Verteilung erhalten werden, da einerseits im Serum neben T_4 auch Trijodthyronin, Dijodthyronin und Monojodthyronin vorhanden ist (30), andererseits eine geringe Menge Thyreoglobulin vorkommt, welches beim Menschen die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit besitzt wie TBG (31). Da gerade mit Hilfe immunochemischer Methoden, insbesondere mit der Immunelektrophorese, gefunden wurde, daß die Serumlipoproteine Thyroxin zu binden vermögen (6–10), andererseits die Immuno-adsorption von INGBAR (3) als die zuverlässigste Methode zur Bestimmung der quantitativen Verteilung der Schilddrüsenhormone unter den Serumproteinen beschrieben ist, sollte mit dieser Methode die Rolle der Lipoproteine als Träger der Schilddrüsenhormone untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß weder α -Lipoproteine (HDL), noch β -Lipoproteine (LDL), noch prae- β -Lipoproteine (VLDL) in der Lage sind, in vivo oder in vitro im Gemisch mit den übrigen Serumproteinen nennenswerte Mengen von Schilddrüsenhormonen zu binden. Selbst nach Absättigung der freien Bindungsstellen des TBPA und TBG mit Thyroxin hat das Albumin für T_4 offenbar noch eine viel größere Bindungsfähigkeit als die Lipoproteine. Die Absättigung erfolgte durch Zusatz von inaktivem T_4 in zweifachem molarem Überschuß unter der Annahme einer 1:1 Bindung von T_4 an diese Proteine und einer Konzentration des TBPA von 30 mg/100 ml Serum und der des TBG von 1–2 mg/100 ml Serum (32). In Abwesenheit aller anderen Serumproteine besitzen reine LDL, VLDL und HDL die Fähigkeit, eine beträchtliche Menge (etwa 80%, wenn die Versuche mit Proteinkonzentrationen vorgenommen werden, die denen im Serum entsprechen) des zugesetzten T_4 - ^{131}J aufzunehmen. Wie die Versuche mit den Lipidemulsionen zeigten, dürfte es sich dabei um keine spezifische Bindung an die Apoproteine sondern um eine Lösung im Lipidanteil auf Grund der Nernst'schen Verteilung handeln. Mit Hilfe dieser Versuche wurde gefunden, daß sich lediglich etwa 65% des zugesetzten T_4 in der Lipidphase befanden, also weniger als in den Lipoproteinen. Dies hat seinen Grund darin, daß beim Emulgieren der Serumlipide in Krebs-Ringer-Lösung Lipidmizellen entstehen, die eine Lösungsfähigkeit für T_4 besitzen. Diese Lipidmizellen wurden bei der präparativen Abtrennung der Lipide in der Ultrazentrifuge nicht aus der wäßrigen Phase entfernt.

Bei der Fällung der Lipoproteine mit Trichloressigsäure (Tab. 4) zeigte sich, daß bei Zusatz der doppelten Menge

dieses Reagenz viel mehr T_4 in der wäßrigen Phase zu finden war als bei Zusatz der einfachen Menge. Hier kommt es offenbar zu einer Verschiebung des Verteilungskoeffizienten. Inaktive Seren (Tab. 1), bei denen die PBI-Werte der Lipoproteinpräzipitate nicht ermittelt werden konnten, wurden untersucht, da radioaktive Humanserum nur von Patienten mit Schilddrüsenstörungen zugänglich waren. Die Ergebnisse waren jedoch in beiden Fällen praktisch identisch.

Von INGBAR (3) wurde bewiesen, daß Antikörper die Bindung von T_4 an TBPA nicht beeinträchtigen. Wie die Adsorptionsversuche mit Aerosil zeigten, kann das gleiche von den Lipoproteinen angenommen werden.

Nach 2maligem Waschen war im Präzipitat eine, wenn auch sehr geringe, Restaktivität zu finden. Da im Serum neben dem proteingebundenen Thyroxin auch ein kleiner Teil freies T_3 und T_4 vorhanden ist (T_4 : 100 $\mu\text{Mol}/100\text{ g Serum}$ und T_3 : 100 $\mu\text{Mol}/100\text{ g Serum}$ (33)), dürfte sich eine geringe Menge im Gleichgewicht in den Lipoproteinen lösen. Dieser Teil genügt jedoch nicht, die Lipoproteinbanden nach Immunelektrophorese und Autoradiographie von in vivo radioaktiv markierten Seren sichtbar zu machen. Die Radioaktivität dieser Seren reichte auch nicht aus, um damit nach einer Immunelektrophorese ein befriedigendes Autoradiogramm der T_4 -bindenden Proteine zu erhalten. Die Fähigkeit der isolierten Lipoproteine, T_4 zu lösen, macht es verständlich, daß nach der von R. W. LIGHTFOOT (34) vorgeschlagenen Methode, bei der nach Beendigung der Immunodiffusion und dem Auswaschen der nicht präzipitierten Proteine, aktives T_4 in den Antiserumschlitz gefüllt wird, Aktivität in den Lipoproteinbanden zu finden ist. Bei der Ausführung der Immunelektrophoresen mit Seren, welche in vivo mit T_4 - ^{131}J versetzt wurden, zeigte sich ebenso eine Schwärzung der Lipoproteinbanden im Autoradiogramm (6). Da Phospholipide, die einen Hauptbestandteil des Lipidanteils der Lipoproteine ausmachen, in der Lage sind, freies Jodid zu binden (35), ist es möglich, daß bei Verwendung unreiner T_4 -Präparate Artefakte entstehen.

Herrn Dr. K. MÜLLER, Assistent am Institut für Allgemeine Chemie, Mikro- und Radiochemie der Technischen Hochschule Graz, danken wir für die Ausführung der Radioaktivitätsbestimmungen und Herrn Doz. Dr. O. EBER, Oberarzt an der Medizinischen Universitätsklinik Graz, für die freundliche Unterstützung und Bereitstellung des Untersuchungsmaterials. Außerdem danken wir dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Überlassung einer Ultrazentrifuge.

Literatur

1. GIORGIO, M., A. NICHOLAS und M. TABACKNICK, J. biol. Chemistry 243, 2247 (1968). — 2. HOLLANDER, CH. S., V. V. ODAK, T. E. PROUT und S. P. ASPER, J. Clin. Endocr., Springfield 22, 617 (1962). — 3. WOEBER, K. A. und S. H. INGBAR, J. Clin. Invest. 47, 1710 (1968). — 4. OPPENHEIMER, J. H. und G. BERNSTEIN, Current Topics in Thyroid Research, Acad. Press. N. Y. 674 (1965). — 5. TATA, J. R., Clin. chim. Acta, Amsterdam 6, 597 (1961). — 6.

MİYAI, K., K. F. H. ABE und Y. KUMAHARA, Clin. chim. Acta, Amsterdam, 23, 341 (1968). — 7. GERHARDS H. J., K. JOSEPH und E. H. GRAUL, Atompraxis 14, 21 (1968). — 8. HOLLANDER, CH. S., B. H. LATIMER, T. E. PROUT, D. H. LOCKWOOD und S. P. ASPER, Metabolism, Baltimore 12, 45 (1963). — 9. ALY, F. W. und K. H. GILLICH in PRETERS H. (Ed.) Protides of the Biological Fluids 8th Colloquium, Brugges 1960, Elsevier Amsterdam 152 (1961). —

10. CLAUSEN, J. und T. MUNKNER in PEETERS H. (Ed.) *Protides of the Biological Fluids*, Brugges 1960, Elsevier Amsterdam 147 (1961). — 11. LOHSS, F. und E. KALLEL in PEETERS H. (Ed.) *Protides of the Biological Fluids*, Brugges 1960, Elsevier Amsterdam 142 (1961). — 12. LIGHTFOOT, R. W. und C. L. CHRISTIAN, *J. Clin. Endocr.* Springfield, 26, 305 (1966). — 13. ROBBINS, J. und J. E. RALL, *Physiol. Rev.* Baltimore 40, 414 (1960). — 14. LUTZ, J. H. und R. I. GREGERMAN, *J. Clin. Endocr.* Springfield 29, 487 (1969). — 15. SQUAF, R. M., K. MARINETZ und J. H. OPPENHEIMER, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.* 113, 837 (1963). — 16. INGBAR, S. H. und L. E. BRAVERMAN, in *Endocrinologica Experimentalis*, S. 253 Publishing House Acad. Sci. Bratislava, (1966). — 17. TAKASHI YAMANDA, A. und E. JONES, *Endocrinology* 82, 47 (1968). — 18. INGBAR, S. H., *Endocrinology* 63, 256 (1958). — 19. KOSTNER, G. und A. HOLASEK, *Biochim. biophysica Acta* Amsterdam 188, 157 (1969). — 20. KOSTNER, G. und A. HOLASEK, *Lipids*, Arbeit zur Publikation eingereicht. — 21. FOLCH, J. M., G. H. S. LEES und S. STANLEY, *J. biol. Chemistry* 226, 497 (1957). — 22. KNAPP, G. und H. SPITZY, *Talanta*, im Druck. — 23. HEIDELBERGER, M. und E. A. KABAT, *J. Exper. Med.* 67, 181 (1938). — 24. STEPHAN, W., L. ROKA, *diese Z.* 6, 186 (1968). — 25. LAUNAY, M. P., *Canad. J. Biochem.* 44, 1657 (1966). — 26. ROBERTS, R. C. und T. F. NICOLAI, *Clin. Chem. New York* 15, 367 (1969). — 27. BRAVERMAN, L. E., B. E. FOSTER und S. H. INGBAR, *J. Clin. Endocr.* Springfield 27, 227 (1967). — 28. FRIEDRICH, Z., E. T. RIPPMANN und V. KAUFMANN, *Schweiz. med. Wschr.* 99/23, 833 (1969). — 29. NEGOËSCO, J. und A. CONSTANTINESCO, *Rev. Roum. Endocrin.* 5, 55 (1968). — 30. WELLBY, M. L. und M. W. O'HALLIVAN, *Biochem. J.* 112, 543 (1969). — 31. TORRIGIANI, G., D. DORIACH und I. M. ROILT, *J. Clin. Endocr.* Springfield 29, 305 (1969). — 32. SCHULTZE, H. F. und J. F. HEREMANS, *Molecular Biology of Human Proteins* S. 175, Elsevier Amsterdam (1966). — 33. HILLMAN, G., *Biosynthese und Stoffwechselwirkungen d. Schilddrüsenhormone*, S. 43, Thieme Verlag Stuttgart (1961). — 34. LIGHTFOOT, R. W., C. L. CHRISTIAN, *J. Clin. Endocr.* Springfield 26, 305 (1966). — 35. PHOPESHERARKAR, G. A. und M. Y. MANDLIK, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.* 192, 571 (1968).

Dr. Gerhard Kostner
 Inst. f. physiologische Chemie
 d. Universität Graz
 Universitätsplatz 2
 A-8010 Graz